

VU Research Portal

Melanoma, the role of basic Fibroblast Growth Factor in the aggressive behaviour and chemotherapy response

Fontijn, D.

2009

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Fontijn, D. (2009). *Melanoma, the role of basic Fibroblast Growth Factor in the aggressive behaviour and chemotherapy response*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, S.l.]. s.n.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

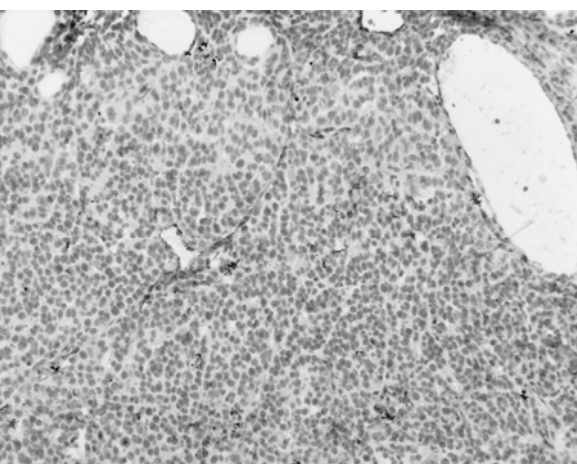
- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl



8

Melanoom, de rol van basic Fibroblast Growth Factor in het agressieve gedrag en chemotherapie respons

Samenvatting

Melanoom is een kwaadaardige tumor van de huid, die ontstaat vanwege ongecontroleerde groei van genetisch veranderde melanocyten, de pigmenthoudende huidcellen in een moedervlek. De oorzaak van deze kwaadaardige tumorsoort is niet volledig bekend. De ultraviolette (UV) stralen in zonlicht spelen een belangrijke rol bij de ontwikkeling van melanoom. De incidentie neemt toe bij blanke mensen, vooral bij rossige huidtypes. Naast UV stralen dragen andere factoren bij tot de ontwikkeling van melanoom, zoals cellulaire groeifactoren. In dit opzicht zou basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) het effect van UV straling kunnen versterken.

Behandeling van het melanoom van de huid bestaat uit chirurgie, zo nodig aangevuld met een schildwachtklier procedure. Bevat de schildwachtklier tumorcellen, dan volgt een regionaal lymfekliertoilet. Chemotherapie en immunotherapie dragen weinig tot niet bij aan verbetering van de overleving bij de gevorderde vorm van melanoom. Het meest bekende middel dat een kans geeft op verkleining van de ziekteomvang is dacarbazine (DTIC). Temozolomide is een imidazotetrazine derivaat dat aan DTIC gerelateerd is. Dit middel is eveneens actief bij melanoom.

Omdat melanoom met uitzaaiingen slechts weinig gevoelig is voor allerlei behandelingen wordt veel onderzoek gedaan naar manieren voor verbetering van de sombere prognose. Momenteel worden veel studies uitgevoerd om immunotherapie bij dit ziektebeeld te verbeteren. Een andere aanpak is het in kaart brengen van moleculen die betrokken zijn bij overlevingsmechanismen of die ervoor zorgen dat chemotherapie niet werkt. Kennis van deze moleculen en de signaleringsroutes in melanoomcellen zullen de weg wijzen naar betere behandelingen.

Wanneer melanocyten kwaadaardig ontaarden, zullen ze onafhankelijk worden van groeifactoren uit de omgeving. Ze zullen zelf zorgen voor de aanmaak van deze groeifactoren, die vervolgens langs een autocrine signaleringsroute de cel aanzetten tot groei, celdeling en overleving. Op dit moment is bFGF de best gekarakteriseerde en waarschijnlijk ook de belangrijkste groeifactor die betrokken is bij de ontwikkeling van een normale melanocyt tot een melanoomcel die gemakkelijk kan uitzaaien. Wanneer normale melanocyten 'geïnfecteerd' worden met een recombinant retrovirus dat het cDNA draagt van het bFGF, gaan deze cellen bFGF eiwit maken. Vervolgens kan worden waargenomen dat de cellen ongecontroleerd gaan groeien, hetgeen wijst op autocrine groeistimulatie. Deze cellen die met bFGF zijn getransformeerd vormen ook tumoren, wanneer ze bij muizen onder de huid worden ingespoten. In tegenstelling tot melanocyten produceren bijna alle melanomen het bFGF eiwit. Het is inmiddels bekend dat bFGF een bijdrage levert aan alle stappen die bij de progressie van melanocyt tot melanoom nodig zijn. Het belang van bFGF als een autocrine groeifactor is bij verschillende studies aangetoond: 1) wanneer bFGF onwerkzaam werd gemaakt door een antilichaam, werd de groei van bFGF-producerende melanoomcellen geremd, 2) wanneer het gen van bFGF of van de receptor van bFGF (FGFR-1) werd geïnactiveerd, verminderde de groei van melanoomcellen, 3) als muizen werden geïnjecteerd met cDNA om het gen van bFGF of FGFR-1 onwerkzaam te maken, hield de groei van geïmplanteed melanoom op.

In dit proefschrift wordt de rol van bFGF onderzocht in het agressieve gedrag van melanoomcellen en hun ongevoeligheid voor chemotherapie. Dit onderzoek is gedaan bij melanoomcellen in weefselkweek (*in vitro*) en bij zogenoemde naakte muizen geïmplanteerd met melanoom (*in vivo*).

In HOOFDSTUK 2 werden vijf verschillende melanoomcellijnen, die oorspronkelijk afkomstig zijn van patiënten, gekarakteriseerd op genexpressie (mRNA) van bFGF. Het mRNA gehalte van bFGF was het laagst in M14 cellen en het hoogst in BRO cellen. Het is bekend dat van bFGF mRNA meerdere bFGF eiwitten worden afgeschreven, die verschillen in molecuulgewicht. De 18, 22, 22,5 en 24 kD bFGF eiwitten konden gemakkelijk in celconcentraten van BRO en BLM cellen zichtbaar worden gemaakt, terwijl dit door de lage concentraties veel moeilijker was in 1F6 en M14 cellen. Ook werd gekeken of er genexpressie was van de receptoren van bFGF. Alle cellijnen bevatten inderdaad mRNA van FGFR-1, FGFR-3 en FGFR-4; mRNA van FGFR-2 was niet duidelijk aanwezig. Om na te gaan of de receptoren functioneerden, werden 1F6 en M14 cellen blootgesteld aan humaan recombinant bFGF (rhbFGF). De cellen werden inderdaad gestimuleerd in groei; 1F6 groeistimulatie was al te meten bij 5 ng/ml rhbFGF, terwijl bij M14 20 ng/ml nodig was. De groeistimulatie ging gepaard met fosforylering van ERK1/2 in M14 cellen, hetgeen erop wijst dat de intracellulaire receptorsignaleringsroute werd geactiveerd. 1F6 cellen bezitten van zichzelf al een hoog gehalte aan gefosforyleerd ERK1/2, waarop rhbFGF geen effect had. Vervolgens vroegen wij ons af wat het effect zou zijn als 1F6 en M14 cellen meer bFGF van zichzelf zouden produceren. Daartoe werd met behulp van een vector het cDNA van het 18 kD bFGF eiwit (18kD) en van alle molecuulgewichten bFGF eiwit (ALL) in de cellen gebracht door middel van 'transfectie'. De controle of de transfectie gelukt was, klopte. De cellen bevatten meer mRNA van de 18 kD en alle bFGF eiwitvormen en produceerden ook meer bFGF eiwit(ten). In de diverse kloons was niet alleen intracellulair meer eiwit aanwezig, maar er bevond zich ook meer eiwit op de celmembraan, waar het gebonden is aan sulfaat proteoglycanen. Hoewel bFGF onder normale omstandigheden niet wordt uitgescheiden, werd toch een kleine hoeveelheid in het kweekmedium aangetroffen. Het geproduceerde bFGF door 1F6 en M14 cellen was biologisch actief. Celconcentraten, die 1,25 ng/ml bFGF bevatten stimuleerden de groei van humane navelstrengendotheelcellen even goed als 1,25 ng/ml rhbFGF. Vervolgens werd de groeisnelheid gemeten van de diverse bFGF-bevattende kloons. 1F6 cellen groeiden significant sneller na bFGF transfectie, zowel *in vitro* als *in vivo*. Dat was niet het geval voor M14 cellen. Na bFGF transfectie waren 1F6 cellen kleiner en ronder, terwijl de oorspronkelijke ('parent') 1F6 cellen groot zijn en uitlopers vormen. Onder de microscoop toonden de M14 parent cellen en de bFGF-bevattende kloons geen verschillen. Tot onze verrassing werden in de tumoren van bFGF-bevattende kloons van 1F6 cellen veel kleine bloedvaatjes gezien. Dit aantal was drie keer groter dan dat in 1F6 parent tumoren. Bij de M14 tumoren was het aantal bloedvaatjes na bFGF transfectie niet toegenomen. Onze waarneming in 1F6 cellen geeft aan dat bFGF transfectie heeft geleid tot autocrine celgroeistimulatie en dat de bloedvaatjesvorming langs een paracrine route moet zijn bevorderd. De verhoogde aanmaak van bloedvaatjes werd echter niet veroorzaakt door bFGF zelf, maar door verhoogde productie van Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) door de tumorcellen. VEGF is een zeer sterke groeifactor voor endotheelcellen. De angiogene stimulatie door de bFGF-

bevattende kloons van 1F6 cellen deed zich voor ongeacht de hoeveelheid van het 18 kD eiwit of van alle bFGF eiwitvormen.

Omdat 1F6 tumoren van de bFGF-bevattende kloons veel kleine bloedvaatjes bevatten, werd onderzocht in HOOFDSTUK 3 op welke manier bFGF de cellen had aangezet tot VEGF productie. In de bFGF-bevattende kloons bleek het mRNA van VEGF 4-5 keer verhoogd aanwezig en werd ook een toegenomen hoeveelheid VEGF eiwit in het kweekmedium aangetroffen. De verhoogde VEGF genexpressie werd veroorzaakt door een toegenomen aanmaak van mRNA en niet door een verminderde afbraak van het mRNA. Dit kon worden aangetoond door de cellen te transfecteren met een VEGF promotor gekoppeld aan luciferase. De luciferase activiteit was veel hoger in de bFGF-bevattende kloons dan in de 1F6 parent cellen, maar de snelheid van afbraak was niet veranderd. In de bFGF-bevattende kloons werd veel gefosforyleerd PI-3K, p38 en ERK1/2 aangetroffen, hetgeen duidt op geactiveerde signaleringsroutes. Na het remmen van deze routes werden het mRNA van VEGF en de VEGF eiwit secretie gemeten. Vooral de PI-3K en in mindere mate de p38 signaleringsroute bleken betrokken te zijn bij de door bFGF aangezette VEGF overexpressie. Bij de vijf verschillende melanoomcellijnen werd vervolgens nagegaan of er een correlatie bestond tussen de hoeveelheid bFGF en VEGF mRNA. Dit was inderdaad het geval ($p < 0,05$; $r^2 = 0,974$). Cellijnen met hoog VEGF mRNA produceerden ook veel VEGF in kweekmedium, zoals de BRO en BLM cellijnen. In eerder onderzoek is aangetoond dat deze cellijnen snel tumoren konden vormen in naakte muizen en ook gemakkelijk uitzaaiden in de longen. De parent 1F6 en M14 cellijnen met lage expressie aan bFGF en VEGF mRNA gedroegen zich minder agressief in naakte muizen. Onze waarnemingen duiden erop, dat bFGF mogelijk ook bij melanoom bij patiënten een faciliterende rol speelt met betrekking tot groeisnelheid, bloedvaatjesvorming en de vorming van uitzaaiingen.

Omdat bFGF-bevattende kloons van 1F6 cellen een versnelde celgroei *in vitro* en *in vivo* hebben en dat er ook *in vivo* meer bloedvaatjes worden gevormd, werd onderzocht in HOOFDSTUK 4 of de cellen ook gemakkelijker invaderen door extracellulaire matrix. CD13/aminopeptidase (CD13) is een eiwit op de celmembraan dat bij invasie behulpzaam is, omdat dit de extracellulaire matrix kan afbreken. CD13 kan bij verschillende tumorsoorten voorkomen, zoals bij het melanoom. In de bFGF-bevattende kloons van 1F6 werd inderdaad 150 keer verhoogd CD13 mRNA aangetroffen. Het eiwit was sterk verhoogd aanwezig op de celmembraan en het was ook biologisch actief. De biologische activiteit kon tot 90% worden geremd met bestatine, een niet-specifieke aminopeptidase remmer. Blootstelling van de cellen aan WM15, een antilichaam dat specifiek CD13 remt, deed de enzymatische activiteit drievoudig dalen. De bFGF-bevattende 1F6 kloons invadeerden sneller door extracellulaire matrix (Matrigel) dan de parent 1F6 cellen. Dit proces kon worden geremd door bestatine en WM15. De migratie van de cellen was niet veranderd, hetgeen erop duidt dat CD13 niet betrokken is bij dit proces. Vervolgens werd onderzocht op welke manier de aanmaak van CD13 mRNA is versneld. Het is bekend dat expressie van CD13 wordt bevorderd door activatie van de distale, oftewel myeloïde promotor of de proximale, oftewel epitheliale promotor van het gen. In de bFGF-bevattende kloons werd aangetoond door transfectie van deze promotors, dat beiden werden geactiveerd. Het was niet mogelijk om met exogeen rhbFGF 1F6 cellen te stimuleren tot CD13 expressie, hetgeen erop duidt dat bFGF transfectie een intracellulaire (intracrine) route aanzet tot

CD13 overexpressie. Ook in deze experimenten werden dezelfde waarnemingen gedaan ongeacht of de 1F6 cellen waren getransfecteerd met het gen dat 18kD bFGF eiwit maakt of met het gen dat alle bFGF eiwitvormen maakt. In de vijf melanoomcellijnen werd een correlatie gevonden tussen bFGF en CD13 mRNA ($p < 0,05$; $r^2 = 0,883$). De twee cellijnen met een bekend agressief gedrag *in vivo*, bevatten veel CD13 en een hoog gehalte aan bFGF. Deze waarnemingen duiden opnieuw op een rol voor bFGF bij het agressieve gedrag van melanoom.

Er is diverse keren in de literatuur gerapporteerd bij cellijnen van andere tumorsoorten, dat bFGF een rol kan spelen bij de gevoeligheid voor chemotherapie. In HOOFDSTUK 5 werd onderzocht, of bFGF ook bij melanoom een rol kan spelen bij de resistentie tegen chemotherapie. De experimenten werden uitgevoerd bij M14 parent cellen en de bFGF-bevattende kloons van M14, omdat er geen verschil in groeisnelheid was ontstaan na transfectie. Immers kunnen verschillen in groei op zich verantwoordelijk zijn voor verschillen in gevoeligheid voor antikanker middelen. Er bleek geen verandering te zijn in gevoeligheid voor doxorubicine en docetaxel, maar de bFGF-bevattende kloons waren significant minder gevoelig voor temozolomide ($p < 0,05$). De kloon met overexpressie van alle eiwitvormen van bFGF was ook significant minder gevoelig voor cisplatin ($p < 0,05$). Temozolomide en cisplatin brengen beiden schade aan aan het DNA in de cel. Wij vroegen ons af, of de temozolomide schade aan DNA in de bFGF-bevattende kloons van M14 beter kon worden gerepareerd als verklaring voor de verminderde gevoeligheid. Inderdaad werd meer O^6 -alkylguanine-DNA-alkyltransferase (AGT), een bekend hersteleiwit van temozolomide schade, aangetroffen. De gevoeligheid voor temozolomide nam weer toe, wanneer de AGT-remmer O^6 -benzylguanine (BG) werd toegevoegd. Herstel van resistentie tegen temozolomide was volledig in M14 kloons met overexpressie van het 18 kD eiwit. In M14 kloons getransfecteerd met alle bFGF eiwitvormen kon BG de temozolomide resistentie slechts gedeeltelijk herstellen, hetgeen duidt op de aanwezigheid van andere resistentiemechanismen. Resistentie tegen cisplatin kon niet met BG worden hersteld. M14 parent cellen konden ook resistent worden gemaakt tegen temozolomide door ze bloot te stellen aan 5-azacytidine, een demethylerend middel. Na enkele dagen kon een verhoogde mate aan AGT worden aangetoond en bleken de cellen resistent te zijn tegen temozolomide. Duidelijk werd dat het gen voor AGT, O^6 -methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT), in M14 parent cellen deels gemethyleerd en ongemethyleerd is. Bij demethylering door 5-azacytidine wordt AGT gevormd. In M14 cellen getransfecteerd met 18 kD bFGF werd alleen ongemethyleerd MGMT aangetroffen; dit was de oorzaak van een verhoogde aanmaak van AGT. In de M14 kloon getransfecteerd met alle bFGF eiwitvormen was geen verandering in de methylering van MGMT zichtbaar, ondanks een verhoogde AGT expressie. Omdat deze kloon ook resistent was tegen cisplatin werden andere hersteleiwitten onderzocht. De eiwitexpressie van MLH1, MSH1 en MSH6 was niet veranderd. Vooralsnog hebben wij geen verklaring voor cisplatin resistentie kunnen vinden. Onze waarnemingen duiden er op, dat bFGF een rol speelt bij resistentie van melanoom tegen chemotherapie. Met name werden de M14 cellen na bFGF transfectie minder gevoelig voor middelen die DNA schade aanbrengen. De resistentie tegen chemotherapie was mede afhankelijk van de mate aan expressie van de verschillende bFGF eiwitvormen.

De generale conclusie van dit proefschrift is dat bFGF is betrokken bij toegenomen melanoom celgroei, invasie en stimulatie van bloedvaatjesvorming. Ook lijkt bFGF betrokken te zijn bij resistentie tegen bepaalde antikanker middelen. Deze experimentele waarnemingen moeten worden vertaald naar de patiënt met melanoom met de vraag of de rol van bFGF bij het agressieve gedrag en de ongevoeligheid voor chemotherapie kan worden bevestigd. Het verdient aanbeveling om bFGF in de kliniek te onderzoeken bij deze processen en om na te gaan of middelen die de bFGF functie remmen, kunnen worden ingezet voor verbetering van de behandeling van deze kwaadaardige ziekte.